

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 216 806 A1

3(51) G 01 N 33/50
G 01 N 31/22

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 253 226 1

(22) 20.07.83

(44) 19.12.84

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72) Lampe, Jochen, Dr. med., DD

(54) Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin

(57) Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Laboratoriumsdiagnostik im Bereich des Gesundheitswesens. Ziel ist ein Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin. Der Teststreifen besteht aus einem Trägermaterial, das mit einem Farbindikator und Pufferungsmitteln imprägniert ist. Gegebenenfalls sind weitere Bestandteile Mittel zur Verhinderung von Auswascheffekten wie wasserlösliche Cellulosederivate, Mittel zur Hintergrundfärbung wie Acridinorange, Echtlchtgelb oder Dipyridamol und Tenside wie Natriumdodecylsulfat, chaotrope Substanzen wie Kaliumrhodanid oder Lithiumchlorid und Denaturantien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid als Modifikatoren der Empfindlichkeit des Proteinnachweises. Der Teststreifen ist durch eine hohe Empfindlichkeit gekennzeichnet. Geringe Proteinkonzentrationen, die aber bereits über der normalerweise mit dem Urin ausgeschiedenen Proteinmenge liegen, werden mit einer deutlich sichtbaren Färbung angezeigt. Mit dem Urin von gesunden Personen werden keine falsch-positiven Ergebnisse erhalten.

ISSN 0433-6461

9 Seiten

BEST AVAILABLE COPY

Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin. Die Teststreifen werden in der Laboratoriumsdiagnostik angewendet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Untersuchung des Urins auf Proteine gehört zu jeder medizinischen Grunduntersuchung zur frühzeitigen Erkennung von Nierenkrankheiten. Der Nachweis von Proteinen ist auch für die Verlaufskontrolle von Patienten mit Nierenerkrankungen sowie für die rechtzeitige Erkennung von Nierenschäden nach Gabe von einigen Arzneimitteln wie z. B. Antibiotika und Zytostatika von Bedeutung.

Ältere Methoden zum Nachweis von Proteinen im Urin sind die heute nur noch vereinzelt durchgeführte Kochprobe mit Essigsäure und die HELLERSche Ringprobe mit Salpetersäure. Weitverbreitet in den klinischen Laboratorien ist der Sulfosalicylsäuretest. Die Methode ist ausreichend empfindlich und erfäßt alle Plasmaproteine, die im Urin vorkommen können, mit gleicher Sensitivität. Orale Antidiabetika, hohe Dosen von Antibiotika, p-Aminosalicylsäure und Röntgenkontrastmittel stören die Reaktion. Nachteilig ist ein gewisser Aufwand (Zentrifugieren bzw. Filtrieren des Urins, Ansetzen der Reagentien, Säuberung der Glasgeräte) (P. Balint (Hrsg.): Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Bd. 1. Volk und Gesundheit, Berlin 1962, Seite 234)..

Zum Nachweis einer Proteinurie werden auch Teststreifen angewendet. Sie sind mit einem pH-Indikator imprägniert, der oberhalb einer definierten Proteinkonzentration mit einem Farbumschlag reagiert. Die Reaktionszone ist in trockenem Zustand gelblich oder schwach grünlich gefärbt und soll Proteine in Abhängigkeit von ihrer Konzentration mit grüner bis blauer Farbe anzeigen. Nach dem Eintauchen in eine Untersuchungslösung erfolgt jedoch oftmals schon eine grünliche Färbung, auch wenn die Probe eiweißfrei ist. Dadurch ist es schwierig, negative von schwach positiven Reaktionen zu unterscheiden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Eindeutigkeit der Farbreaktion beim Nachweis von Proteinen im Urin mittels Teststreifen zu verbessern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Teststreifen mit einem saugfähigen Träger für den Farbindikator zu entwickeln.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin auf der Basis saugfähiger Materialien wie Papier oder Vliese gelöst. Der erfindungsgemäße Teststreifen ist dadurch gekennzeichnet, daß er als Farbindikator eine Verbindung der allgemeinen Formel I (vgl. Anlage) und Pufferungsmittel enthält, wobei als Puffer Citronensäure/Phosphat, Citronensäure/NaOH oder Bernsteinsäure/NaOH verwendet werden. Weiterhin werden dem Streifen gegebenenfalls Mittel zur Verhinderung von Auswascheffekten wie wasserlösliche Cellulosederivate, gegebenenfalls Farbstoffe zur Hintergrundfärbung sowie gegebenenfalls Tenside, chaotrope Substanzen oder Denaturantien zur Modifizierung der Empfindlichkeit zugesetzt.

Bei einer durch eine Nephropathie bedingten Proteinurie werden vorwiegend Albumine ausgeschieden. Weiterhin liegen in wesentlich geringerer Konzentration die Antikörper IgM, IgG und IgA, Lambda- und Kappa-Ketten, Transferrin, Haptoglobin, Lysozym sowie mehrere Globulinfraktionen vor. Für die Diagnose und Differentialdiagnose von Nephropathien reicht es aus, wenn das Albumin als Hauptbestandteil der Proteine im Urin nach-

gewiesen wird und die Globuline und die anderen Proteinfraktionen nur in einem geringeren Ausmaß erfaßt werden, da die Ausscheidung von Albumin sich in den meisten Fällen proportional zum Gesamtprotein verhält.

Die Proteine, hauptsächlich aber das Albumin, binden Farbindikatoren der allgemeinen Formel I (vgl. Anlage) in ihrer anionischen Form. Bei dieser Bindung zeigen die Farbindikatoren einen Farbumschlag in Richtung auf die Salzform, obwohl der pH-Wert des Milieus konstant bleibt (Indikatorfehler). Es werden solche Farbindikatoren gewählt, die einen deutlichen Farbumschlag zeigen. Die im Urin vorkommenden Salze dürfen dabei die Färbung nicht beeinflussen.

Der pH-Wert des zur Imprägnierung verwendeten Puffers richtet sich nach dem Umschlagspunkt des Farbindikators der allgemeinen Formel I (vgl. Anlage). Vorzugsweise werden solche Farbstoffe in den Träger eingearbeitet, deren beide Umschlagspunkte sich im sauren pH-Bereich befinden. Erfindungsgemäße Beispiele für die Farbindikatoren sind m-Cresolpurpur, p-Xylenolblau, Thymolblau, Bromchlorphenolblau, Bromphenolblau, Bromcresolgrün, Chlorphenolrot, Bromphenolrot, Bromcresolpurpur und Bromthymolblau. Der pH-Wert des Puffers soll in der Nähe des sauren Umschlagspunktes des Farbindikators liegen.

Ein saurer pH-Bereich wird auch deshalb gewählt, weil die Farbindikatoren eine maximale Bindung an die Proteine im sauren Milieu zeigen. Von Vorteil ist hierbei weiterhin, daß eventuell an Albumin gebundenes und mit dem Urin ausgeschiedenes Bilirubin bei sauren pH-Werten freigesetzt wird, so daß Farbindikator und Bilirubin nicht um die Bindungsstellen am Proteinmolekül konkurrieren.

Der Puffer muß eine starke Pufferungskapazität haben. Durch die Pufferung wird verhindert, daß die OH^- - und H^+ -Ionen im Urin den pH-Wert des imprägnierten Trägers nach dem Anfeuchten verändern und eventuell schon einen Umschlag des Farbindikators hervorrufen, obwohl kein Protein im Urin vorhanden ist.

Das Auswaschen des Pufferungsmittels und des Farbindikators wird dadurch verhindert, daß der Imprägnierlösung gegebenen-

falls wasserlösliche Cellulosederivate wie z. B. Cellulosesulfat oder Carboxymethylcellulose zugesetzt werden. Dadurch bleibt die Pufferkapazität des imprägnierten Trägers nach dem Eintauchen in den Urin konstant und es wird vermieden, daß ausgewaschene Pufferbestandteile und der Farbindikator weitere Untersuchungen, die mit der gleichen Urinprobe nach dem Proteinachweis erfolgen sollen, stören.

Die Konzentration des Farbindikators der allgemeinen Formel I (vgl. Anlage) hängt vom pH-Wert des Pufferungsmittels und dem verwendeten Trägermaterial ab. Bei einem Träger mit einer relativ starken Schichtdicke, z. B. Chromatographiepapier, und bei einem pH-Wert in der Nähe des sauren Umschlagspunktes kann die Imprägnierung mit einer niedrigeren Farbindikatorkonzentration erfolgen. In diesem Fall ergibt proteinfreier Urin bzw. Urin von gesunden Personen mit einer sehr geringen Proteinkonzentration eine eindeutig negative Reaktion. Ein eventuell entstehender Farbumschlag wird dann sicher erkannt und ist auf eine höhere (pathologische) Proteinkonzentration zurückzuführen. Wählt man dagegen eine höhere Farbindikatorkonzentration und eine geringere Schichtdicke des Trägers, so tritt auch bei einer niedrigen Proteinkonzentration schon eine leichte Färbung auf, die sich bei Anstieg der Proteinmenge verstärkt. Unterschiedliche Intensitäten eines Farbtons sind jedoch schwieriger zu differenzieren als ein Farbumschlag von einem Farbton in einen anderen.

Deshalb ist die Zusammensetzung der Imprägnierlösung von dem Aufnahmevermögen des Trägermaterials und vom Indikatorfehler des Farbindikators abhängig. Die günstigste Variante ist ein Träger mit hohem Aufnahmevermögen, der mit einer Imprägnierlösung von geringer Farbindikatorkonzentration behandelt worden ist.

Gegebenenfalls kann zusammen mit der Imprägnierung oder im Anschluß daran noch eine Hintergrundfärbung des Papiers mit gelben Farbstoffen erfolgen. Bewährt haben sich Echtlichtgelb, Acridinorange sowie Dipyrindamol. Durch die Hintergrundfärbung wird die Unterscheidbarkeit zwischen negativen und schwach positiven Reaktionen zusätzlich verbessert.

Die Empfindlichkeit des Teststreifens kann dadurch gesteigert werden, daß der Imprägnierlösung Verbindungen, die Wasserstoffbrücken schwächen oder lösen, zugesetzt werden. Dazu gehören Tenside wie Natriumdodecylsulfat, chaotrope Substanzen wie Kaliumrhodanid und Lithiumchlorid und die Denaturantien Harnstoff und Guanidin. Durch diese Verbindungen kommt es konzentrationsabhängig zu einer Auffaltung bzw. Denaturierung der Proteine und die Anzahl der Bindungsstellen für die Farbindikatormoleküle nimmt zu. Daraus resultiert eine intensivere Färbung auch schon bei geringer Proteinkonzentration im Urin.

Der erfindungsgemäße Teststreifen zeichnet sich durch eine deutlich unterschiedliche Färbung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Urin aus. Durch den Zusatz von Denaturantien sowie von Tensiden und chaotropen Substanzen steigt die Empfindlichkeit der Teststreifen um etwa 50 % an. Es wurden keine falsch-positiven Ergebnisse mit dem Urin von gesunden Personen erhalten.

Ausführungsbeispiel

1. 20 mg Bromphenolblau werden in 100 ml Citronensäure/Phosphat-Puffer nach McIlvain mit einem pH-Wert von 2,7 gelöst. In diese Lösung wird entsprechend zugeschnittenes Chromatographiepapier gelegt und nach dem Herausnehmen und Abtropfen bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete Papier ist gelb gefärbt.

Das imprägnierte Papier wird in Längsstreifen mit einer Breite von 1 cm geschnitten und auf eine Kunststoffolie geklebt. Diese wird in Streifen von 0,5 cm Breite geschnitten. Jeder Teststreifen hat eine Reaktionszone von 0,5 x 1 cm.

Zur Prüfung des Urins auf Proteine wird der Teststreifen einige Sekunden in die Untersuchungslösung getaucht und der nicht aufgesaugte Urin durch Abstreifen der seitlichen Kante am Gefäßrand entfernt. Die Reaktion wird nach 30 bis 60 Sekunden abgelesen. Eine leichte Blaufärbung tritt bei Anwesenheit von etwa 30 mg Serumprotein/100 ml Urin auf. Höhere Konzentrationen verursachen eine intensivere Blaufärbung.

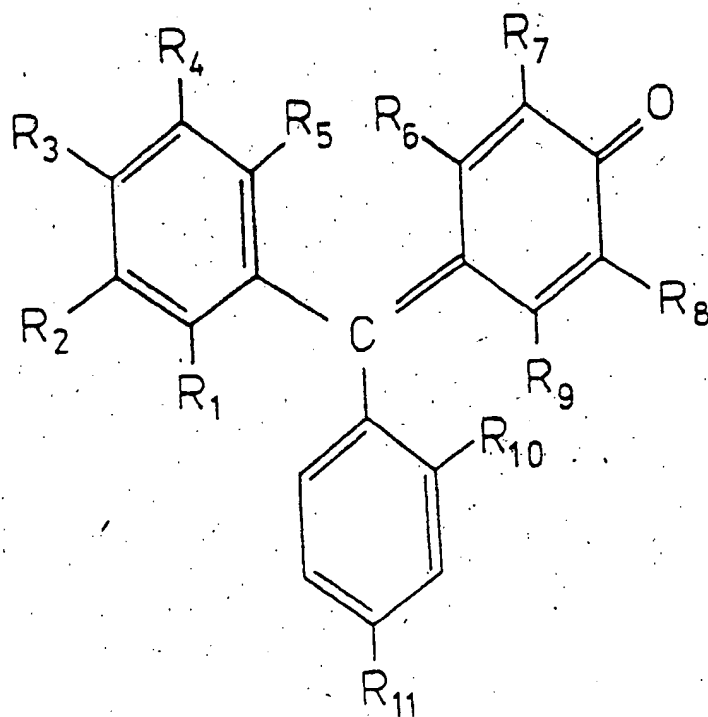
2. 100 mg Bromcresolgrün-Natriumsalz werden in 100 ml einer 0,25 molaren Citronensäurelösung, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt wurde, gelöst. Das weitere Vorgehen bei der Imprägnierung und Herstellung der Teststreifen erfolgt wie unter Beispiel 1 beschrieben. Der Teststreifen hat auch ähnliche Eigenschaften.
3. 80 mg Bromcresolpurpur werden in 100 ml einer 0,10 molaren Bernsteinsäurelösung, die mit NaOH auf einen pH-Wert von 4,7 eingestellt wurde, gelöst. Das nach der Imprägnierung getrocknete Papier ist gelb gefärbt und schlägt nach dem Eintauchen in proteinhaltigen Urin in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration nach purpur um.
4. Der Streifen wird hergestellt wie unter Beispiel 1 beschrieben, jedoch werden der Imprägnierlösung außerdem 500 mg Cellulosesulfat zugesetzt. Der auf diese Weise erhaltene Streifen zeigt eine leichte Farbverstärkung beim Eintauchen in proteinhaltigen Urin, da der Farbindikator und der Puffer nicht in die Untersuchungsprobe diffundieren.
5. Der Streifen wird hergestellt wie unter Beispiel 1 beschrieben, jedoch werden der Imprägnierlösung außerdem 50 mg Acridinorange zugesetzt. Der auf diese Weise erhaltene Streifen ist stark gelb gefärbt, so daß eine deutliche Unterscheidung gegenüber der Färbung, die bei einer Proteinkonzentration von etwa 25 mg/100 ml Urin auftritt, möglich ist.
6. Der Streifen wird hergestellt wie unter Beispiel 1 beschrieben, jedoch werden der Imprägnierlösung außerdem 2 g Kaliumrhodanid zugesetzt. Der auf diese Weise erhaltene Streifen ist gelblich gefärbt und zeigt eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg/100 ml Urin an.
7. Der Streifen wird hergestellt wie unter Beispiel 1 beschrieben, jedoch werden der Imprägnierlösung außerdem 30 g Guanidinhydrochlorid zugesetzt. Der auf diese Weise erhaltene Streifen ist leicht gelblich gefärbt und zeigt eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg/100 ml Urin mit blauer Farbe an.

Erfindungsanspruch

1. Teststreifen zum Nachweis von Proteinen im Urin auf der Basis saugfähiger Materialien wie Papier und Vliese gekennzeichnet dadurch, daß der Streifen als Farbindikator eine Verbindung der allgemeinen Formel I (vgl. Anlage), Pufferungsmittel, gegebenenfalls Mittel zur Verhinderung von Auswascheffekten wie wasserlösliche Cellulosederivate, gegebenenfalls Mittel zur Hintergrundfärbung wie Echtlichtgelb, Acridinorange oder Dipyridamol und gegebenenfalls Tenside wie Natriumdodecylsulfat, chaotrope Substanzen wie Kaliumrhodanid oder Lithiumchlorid sowie Denaturantien wie Guanidin oder Harnstoff zur Modifizierung der Empfindlichkeit enthält.
2. Teststreifen nach Punkt 1 gekennzeichnet dadurch, daß als Pufferungsmittel insbesondere Citronensäure/Phosphat, Citronensäure/NaOH oder Bernsteinsäure/NaOH enthalten sind.

Patent 1.034.000

Anlage



I

- $R_1 = R_9 = \text{H, Alkyl}$
 $R_2 = R_5 = R_6 = R_8 = \text{H, Cl, Br, Alkyl, Isopropyl}$
 $R_3 = \text{H, OH}$
 $R_4 = R_7 = \text{H, Cl, Br, Alkyl}$
 $R_{10} = \text{H, COOH, SO}_3\text{H}$
 $R_{11} = \text{H, OH}$

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.